

氏 名	相 澤 有 美
学位(専攻分野の名称)	博 士 (農芸化学)
学 位 記 番 号	甲 第 711 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 28 年 3 月 20 日
学 位 論 文 題 目	<b>TSC2 ヘテロ欠損が肝臓と骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響の解析</b>
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・農 学 博 士 山 本 祐 司 教 授・博士(農芸化学) 内 野 昌 孝 教 授・博士(農学) 阿 部 尚 樹 理 学 博 士 小 林 敏 之*

## 論文内容の要旨

### 背景・目的

Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) は、TSC1 とともに難治性疾患である結節性硬化症の原因遺伝子産物である。TSC2 は、TSC1 と複合体を形成し、Ras homolog enriched in brain (Rheb) の GTPase-activating protein (GAP) として機能を果たすことで、mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の活性を制御している。従って、TSC2 の変異や欠損は、Rheb の活性を制御できなくなるため mTORC1 が過剰に活性化し、腫瘍の形成を引き起こすものと考えられている。

その一方で、インスリンによる AKT/PKB (Protein kinase B) の活性化により TSC2 が不活化され、mTORC1 が活性化し、脂質合成や糖代謝が亢進することから、TSC2 はインスリンシグナルの中間因子として、エネルギー代謝の制御に関与している。その為、TSC2 の異常により惹起されるエネルギー代謝の変動が、生体内のストレスとなって、本疾患の発症と関連している可能性が推察される。

TSC2 の研究に関しては、TSC2 遺伝子の全身性の両アレル欠損および変異が胎生致死となることから、臓器特異的な TSC2 欠損動物個体を用いて行われ、数多くの知見を得てきた。しかし、本疾患の患者は TSC2 遺伝子の片アレルのみの変異・欠損を保持している場合がほとんどであり、上記の動物モデルでは、十分な病態を明らかにすることはできない。本研究で用いる Eker ラットは、TSC2 遺伝子の片アレルが欠損しているラット (TSC2 +/-) であり、生後 1 年で腎臓に腫瘍を形成する。これは、TSC2 遺伝子のヘテロ接合性消失 (Loss of Heterozygosity : LOH) により、TSC2 が不活化する

ことで腫瘍形成に至るものと考えられる。従って、Eker ラットは、本疾患と非常に類似した病態の実験動物モデルであるといえる。しかし、Eker ラットを用いて、腫瘍形成に至るプロセスにおいて TSC2 +/- が及ぼす影響について解析しようとした事例はない。

本研究では Eker ラットを用いて、TSC2 のヘテロ欠損が生体のエネルギー代謝にどのような影響を及ぼしているのかについて着目し検討を行った。具体的には、血清の生化学的解析を踏まえ、肝臓及び骨格筋のエネルギー代謝における糖・脂質代謝産物の解析、並びにそれに関わる遺伝子群の発現量の解析を行った。

### 結果・考察

#### 1. 血清生化学解析

雄性的野生型 (TSC2 +/+ : WT) 及び Eker ラット (TSC2 +/-) を、飼料 AIN-93G にて 20 週齢まで飼育し、屠殺 16 時間前に絶食したものを解析に用いた。

血清生化学解析の結果、Eker ラットは血清グルコース、総ケトン体濃度の有意な増加が認められた。その一方で、インスリン濃度に影響は認められなかった。また、総ケトン体における  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 ( $\beta$ OHB) とアセト酢酸 (AcAc) を解析した結果、通常とは異なり  $\beta$ OHB の有意な低下と AcAc の有意な増加が認められた。これらの結果から、Eker ラットではインスリン非依存的な糖・脂質代謝異常が考えられ、II 型糖尿病と酷似した病態であることが推察された。

#### 2. 肝糖新生関連酵素の mRNA 発現量の解析

II 型糖尿病では、肝臓での糖新生が亢進するため高血糖になることが知られている。そこで、Eker ラットの高血糖に肝糖新生が関与しているのか糖新生律速酵素

\* 順天堂大学大学院 医学研究科 分子病理病態学 准教授

Glucose-6-phosphatase (G6Pase), Fructose-1, 6-bisphosphates (FBPase), Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 及びグリコーゲン分解に関与する Glycogen phosphorylase (PYGL) mRNA 発現量を Real-time PCR 法を用いて解析した。その結果、予想に反して PEPCK の mRNA 発現量は WT と比べ Eker ラットにて減少し、G6Pase や FBPase, PYGL においても mRNA 発現量に変化は認められなかった。以上の結果より、Eker ラットの血清グルコース濃度の増加に肝糖新生機構の関与は低いことが示唆され、II 型糖尿病の高血糖の原因と異なることが示唆された。

### 3. 肝ケトン体合成機構の解析

II 型糖尿病では糖の代替エネルギーとして血清中の遊離脂肪酸 (NEFA) や肝臓内に貯蔵されているトリアシルグリセロール (TAG) を利用し、ケトン体が肝臓で合成される。そこで、血清 NEFA の定量解析を行った結果、Eker ラットの血清 NEFA 濃度は WT と比べ変動が認められなかった。従って、ケトン体合成の基質は、血清 NEFA に起因しないことが示唆された。次に、肝臓内の TAG 量、 $\beta$  酸化の律速酵素 carnitine palmitoyltransferase type I a (CPT1a) の mRNA 発現量の解析を行った。その結果、Eker ラットでは、肝臓内の TAG の減少と CPT1a mRNA 発現量の増加が認められた。さらに、 $\beta$  酸化によって生じるアセチル-CoA の解析を行った。その結果、Eker ラットは WT と比べアセチル-CoA 量が有意に増加していた。

以上の結果から、Eker ラットは肝臓内の TAG が分解されることでアセチル-CoA が増加し、ケトン体合成に利用されたことが示唆された。

一方で、Eker ラットは通常とは異なり血清 AcAc 濃度の増加が認められた。その為、肝臓におけるケトン体合成に関与する酵素の発現の変化により、血清 AcAc 濃度が増加したのではないかと推察した。そこで、AcAc を含むケトン体の合成律速酵素である 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2) 及び AcAc を  $\beta$ OHB に変換する酵素である 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH) の遺伝子発現の解析を行った。その結果、HMGCS2 の mRNA 発現量は WT との差異が認められず、さらに予想に反し、HBDH の mRNA 発現量の増加が認められた。一方、HBDH は AcAc を  $\beta$ OHB に変換する際に、補酵素として NADH の酸化反応を伴うことが知られている。そこで、Eker ラットにおける肝臓内の NADH / NAD<sup>+</sup> 比の解析を行ったところ、Eker ラットの肝臓内の NADH / NAD<sup>+</sup> 比の低下が認められた。

これらの結果から、Eker ラットにおける  $\beta$ OHB と AcAc の増加は、肝臓中の TAG から産生されたアセチル-CoA によるものであること、また、異常な AcAc 濃度の上昇は、HBDH の mRNA 発現量の低下によるのではなく NADH / NAD<sup>+</sup> 比の低下による HBDH の酵素活性の阻害による可能性が示唆された。

### 4. 肝ミトコンドリア NADH / NAD<sup>+</sup> 比の制御経路の解析

次に、Eker ラットの肝ミトコンドリア NADH / NAD<sup>+</sup> 比が低下した要因について検討を行った。まず TCA サイクルに着目し解析を行った結果、肝臓内の ATP 量の減少と TCA サイクルの律速酵素 Citrate synthase (CS) の mRNA 発現量の減少が認められた。さらに、TCA サイクルの出発基質であるアセチル-CoA の蓄積が認められたことから、Eker ラットの肝臓では、TCA サイクルの抑制が示唆された。

細胞質で合成された NADH をミトコンドリアへ輸送する経路であるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルについて検討を行った。リンゴ酸、アスパラギン酸を LC/MS, アミノ酸アナライザーを用い定量解析を行った。その結果、Eker ラットにおけるリンゴ酸濃度は、WT と比べ差異は認められなかったものの、アスパラギン酸の有意な減少が認められた。これらの結果から、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの抑制が示唆された。

リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルは、解糖系と連動していることから、最後に解糖系に及ぼす影響について検討を行った。解糖系の活性の指標である乳酸/ピルビン酸比を測定する為、これらを LC/MS を用いた定量解析を行った。その結果、乳酸/ピルビン酸比の有意な増加が認められ解糖系の阻害が推察された。さらに、解糖系律速酵素である Glucokinase (GK), Pyruvate kinase (PK) 及び肝臓のグルコース取り込みに関与する Glucose transporter 2 (GLUT2) の mRNA 発現量を測定した。その結果、Eker ラットにおいて、GK の mRNA 発現量の有意な減少が認められた。一方で、PK や GLUT2 mRNA の発現量に影響は認められなかった。これらの結果から、Eker ラットは解糖系の律速酵素の減少による解糖系の抑制が示唆された。

肝臓内の NADH / NAD<sup>+</sup> 比の制御経路の解析により、Eker ラットの肝臓では解糖系が抑制された結果、細胞質での NADH 合成が抑制されリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルが阻害されることにより、ミトコンドリア内への NADH 供給が低下していることが示唆された。さらには TCA サイクルの抑制が起こりミトコンドリア内の NADH / NAD<sup>+</sup> 比の低下が生じたものと示唆された。

## 5. 骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響の解析

Eker ラットは、血清グルコース及びケトン体濃度の増加が認められていることから、グルコースやケトン体の利用臓器である骨格筋のグルコース代謝に着目し、解糖系律速酵素である Hexokinase 2 (HK2) と Pyruvate kinase muscle isozymes 1 (PKM1) の mRNA 発現量の解析を行った。その結果、PKM1 の mRNA 発現量は WT と比べ Eker ラットとの差異は認められなかったものの、HK2 遺伝子の mRNA 発現量の有意な減少が認められた。従って、Eker ラットは骨格筋においても解糖系の抑制が示唆された。

骨格筋では、エネルギー源としてのグルコース利用が低下すると、その代替エネルギーとしてケトン体及び脂質の利用が多くなる。そこで、骨格筋におけるケトン体の利用に及ぼす影響を解析する為に、AcAc をアセトアセチル-CoA に変換する 3-oxo-acid CoA-transferase (OXCT1) の mRNA 発現量の解析を行った。その結果、Eker ラットの骨格筋では、OXCT1 遺伝子の mRNA 発現量は WT に比べ有意に減少していた。

さらに、骨格筋中の脂質の定量解析を行った結果、骨格筋中の TAG 量に差は認められなかったものの NEFA 量は WT と比べ有意な減少が認められた。このことから、Eker ラットの骨格筋では、脂肪酸の  $\beta$  酸化の亢進や取り込みが抑制されていることが推察された。その為、CPT1b や血清脂質の取り込みに関与する Lipoprotein lipase (LPL) の mRNA 発現量の検討を行った。その結果、Eker ラットの骨格筋では、CPT1b, LPL 遺伝子の mRNA 発現量は WT に比べ有意に減少していた。以上の結果から、Eker ラットの骨格筋では糖や脂質だけではなく、ケトン体の利用の低下もしていることが示唆された。

## 6. 骨格筋のミトコンドリア機能の解析

Eker ラットの骨格筋では、エネルギー代謝が低下していたことから細胞内のエネルギー基質である ATP 量の低下が推察された。そこで、ATP 量の定量を行ったところ、WT と比較し、Eker ラットで ATP 量の有意な減少が認められた。ATP は主にミトコンドリアの好氣的代謝によって合成される。そこで、ミトコンドリア内で行われるエネルギー代謝に着目し、代謝酵素の mRNA 発現や代謝産物の測定を行った。まず、骨格筋内の TCA サイクルに関与する代謝産物量と遺伝子発現の解析を HPLC, LC/MS 及び Real-time PCR 法を用いて行った。その結果、Eker ラットの骨格筋では CS の mRNA 発現量の減少、アセチル-CoA の増加 ( $p < 0.08$ ) とフマル酸の減少 ( $p < 0.08$ ) が認められた。これらの

結果より、Eker ラットの骨格筋における ATP 合成の低下は、TCA サイクルの抑制により誘導されていることが示唆された。さらに、ミトコンドリア機能障害の指標である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA の発現量の検討を行った。興味深いことに、Eker ラットは WT と比べ、GAPDH 遺伝子の mRNA 発現量の減少が認められた。このことから、骨格筋のミトコンドリア機能障害が生じていることが示唆された。

ミトコンドリア機能の低下時に、エネルギー代謝が低下するためピルビン酸は細胞質で乳酸やアラニンに変換される、もしくは、ピルビン酸として血液中に放出される。そこで、血清ピルビン酸、乳酸やアラニン濃度を LC/MS, アミノ酸アナライザーによる定量解析を行った。その結果、Eker ラットにおいて血清ピルビン酸、アラニンの蓄積が認められた。これらの結果より、Eker ラットは骨格筋のミトコンドリア機能障害が示唆された。

次に、Eker ラットの骨格筋のミトコンドリアの数を解析する目的で、ミトコンドリア DNA に含まれている NADH dehydrogenase subunit5 (ND5) と核 DNA に含まれている The solute carrier family 16, member1 (SLC16m1) の測定を Real-time PCR 法にて行った。その結果、ミトコンドリア DNA 量は WT に比べ Eker ラットにおいて有意な減少が認められたことから、Eker ラットの骨格筋ではミトコンドリア数の減少が示唆された。一方、ミトコンドリア数及びミトコンドリア機能は、mTORC1 により制御されることが報告されている。これは、mTORC1 が peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC 1 $\alpha$ ) 及び mitochondrial transcription factor A (Tfam) の遺伝子発現の制御することにより、ミトコンドリアの生合成に寄与するためである。そこで、Eker ラットにおける骨格筋中の TSC2, mTORC1 活性の指標である S6 ribosomal protein (S6) のリン酸化 pS235/236-S6 の解析を western blot 法を用いて行った。その結果、Eker ラットの骨格筋では TSC2 の減少とリン酸化 S6 の亢進が認められた。よって Eker ラットの骨格筋において、TSC2 の減少による mTORC1 の過剰な活性化が示された。次に、PGC1 $\alpha$  と Tfam 遺伝子の mRNA 発現量に着目し解析を行った。しかし、Eker ラットの PGC1 $\alpha$  と Tfam の mRNA 発現量が、mTORC1 の活性化にもかかわらず WT と比べ変化が認められなかった。以上の結果から、骨格筋のミトコンドリア数及び機能の減少は mTORC1 活性の上昇とは相関が取れずこの2つの現

象は、独立したシグナル伝達機構により制御されることが示唆された。

## 総括

本研究では、TSC2のヘテロ欠損が生体のエネルギー代謝に及ぼす影響について、Ekerラットを用いて解析を行った。血清解析の結果、Ekerラットでは、グルコース、AcAc、ピルビン酸、アラニン濃度の上昇が認められた。

Ekerラットのグルコース濃度の上昇は、肝臓・骨格筋の解糖系の抑制による糖の利用低下が原因であることを明らかにした。また、肝における糖新生の抑制が認め

られたことから糖新生の基質であるアラニンの濃度の上昇が生じたものと考察した。血清 AcAc 濃度の上昇は、解糖系の抑制を起因とする  $\beta$ OHb の合成の阻害また、骨格筋でのミトコンドリア障害による AcAc の利用低下が原因であることを明らかにした。また、骨格筋のミトコンドリア障害によりピルビン酸の濃度の上昇が観察された。

以上の結果から、全身性の TSC2 +/− では、生体内のエネルギー代謝に関する臓器間クロストークに異常を呈していることを明らかにした。また、この異常の結果として変動した血中成分がストレスとなり、腫瘍形成に関与しているという新たな腫瘍病態モデルを提唱した。

## 審査報告概要

がん抑制遺伝子の一つ TSC2 +/− により惹起されるエネルギー代謝の変動が、生体内のストレスとなり、腫瘍の発症を惹起していると仮説を立て、全身の TSC2 がヘテロ欠損した Eker ラット (TSC2 +/−) を用い代謝とそのメカニズムの解析を行った。野生型 (TSC2 +/+) と Eker ラットの血清解析の結果、グルコース、アセト酢酸、ピルビン酸、アラニン濃度の増加が示された。また、肝臓と骨格筋のエネルギー代謝の解析により、血清中のグルコース濃度の増加は、TSC2 +/− による肝臓及び骨格筋の解糖系の抑制により生じている可能性が推察

された。さらに、Eker ラットの骨格筋では、脂質及びケトン体の利用が低下しており、これは骨格筋のミトコンドリア機能・数が低下によるものと示唆された。本研究により、全身性の TSC2 +/− によって肝臓と骨格筋の代謝クロストークの破綻が生じ、これが腫瘍形成の一要因となる可能性という新規性のある知見を得たことを評価した。

よって、審査員一同は博士（農芸化学）の学位を授与する価値があると判断した。